

[文章编号] 1007-3949(2010)18-02-0091-05

• 实验研究 •

# 人肌纤生成调节因子 1 真核表达载体的构建及其在乳鼠心肌细胞中的表达

王晓初<sup>1</sup>, 刘秀华<sup>1</sup>, 李 婷<sup>2</sup>, 韩文玲<sup>2</sup>

(1. 中国人民解放军总医院病理生理研究室, 北京市 100853; 2 北京大学人类疾病基因研究中心, 北京市 100083)

[关键词] 肌纤生成调节因子 1; 质粒构建; 乳鼠心肌细胞

[摘要] 目的 构建人肌纤生成调节因子 1 全长的真核表达质粒, 并观察其在 HEK293T 细胞系及 Sprague-Dawley 乳鼠心肌细胞中的表达。方法 从 NCBI GenBank 数据库中克隆得到人肌纤生成调节因子 1 基因 (AF417001) 全长序列, 与真核表达载体质粒 pcDNA3.1/Myc-His(-)B 连接并转化大肠杆菌 XL1-Blue 筛选阳性克隆, T7 引物测序, 转染细胞后以逆转录聚合酶链反应、Western Blotting 方法检测人肌纤生成调节因子 1 的表达。结果 pcDNA3.1/Myc-His(-)B-hMR-1 质粒经测序证实目的基因序列正确, 无碱基突变。该质粒转染到 HEK293T 细胞系和乳鼠心肌细胞后人肌纤生成调节因子 1 的转录水平及表达水平明显增高。结论 成功构建了人肌纤生成调节因子 1 全长的真核表达载体并确定了简便有效的乳鼠心肌细胞瞬时转染方法。

[中图分类号] Q81

[文献标识码] A

## Construction of Human Myofibrillogenesis Regulator-1 Gene Eukaryotic Vectors and Its Expression in Neonatal Rat Cardiomyocytes

WANG Xiao-Reng<sup>1</sup>, LIU Xiu-Hua<sup>1</sup>, LI Ting<sup>2</sup>, and HAN Wen-Ling<sup>2</sup>

(1. Department of Pathophysiology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853; 2. Center for Human Disease Genomics, Beijing 100083, China)

[KEY WORDS] Myofibrillogenesis Regulator-1; Plasmid Construction; Neonatal Rat Cardiomyocytes

[ABSTRACT] **Aim** To construct the human myofibrillogenesis regulator-1 (hMR-1) full length eukaryotic expression plasmid and measure its expression in HEK293T cell lines and Sprague-Dawley neonatal rat cardiomyocytes.

**Methods** The whole hMR-1 coding gene was cloned from NCBI GenBank database (AF417001), recombined with plasmid pcDNA3.1/Myc-His(-)B and transformed into Escherichia coli XL1-Blue. Positive clone was selected and sequenced by T7 primers. The recombined plasmid pcDNA3.1/Myc-His(-)B-hMR-1 was transfected by Lipofectamine 2000 to cells. reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western Blotting was employed for measuring the expression of hMR-1. **Results** Plasmid pcDNA3.1/Myc-His(-)B-hMR-1 was verified by sequencing that the target gene was correct without any mutation; the expression level at mRNA and protein were both increased significantly after hMR-1 transfection. **Conclusion** A full-length hMR-1 coding gene eukaryotic vector was successfully constructed based on which a convenient and effective transient transfection method in neonatal rat cardiomyocytes was established as well.

人肌纤生成调节因子 1 (human myofibrillogenesis regulator-1, hMR-1) 是本课题组新报道的人类功能基因<sup>[1]</sup>, 定位于 2q35, mRNA 全长 755 bp 编码一段 142 个氨基酸组成的蛋白质, 在心肌、骨骼肌中有高表达。前期工作发现该基因与心肌肥大相关, 特别是对血管紧张素  $\text{Ang}(\text{I})$  ( $\text{Ang}(\text{I})$ ) 诱导的心肌肥大具有强化作用<sup>[2]</sup>。目前关于 MR-1 分

子的结构和功能研究尚存诸多空白, 亟待进一步探索, 由此我们构建了 hMR-1 全长的真核表达质粒并观察其在乳鼠心肌细胞中的表达, 为进一步探明 hMR-1 在心肌细胞肥大过程中的生物学功能提供重要的研究支持。

## 1 材料和方法

### 1.1 质粒和细胞

真核表达载体 pcDNA3.1/Myc-His(-)B (以下简称 pCDDB)、中间载体质粒 pGEM-T Easy 购自美国 Invitrogen 公司; 大肠杆菌 (*Escherichia coli* E. coli) XL1-Blue 菌种、人胚胎肾上皮细胞 HEK293T 获自

[收稿日期] 2010-01-18 [修回日期] 2010-02-20

[基金项目] 国家自然科学基金 (30770902) 和国家重点基础研究发展计划 (2007CB512003), 北京市自然科学基金 (7072085)

[作者简介] 王晓初, 博士研究生, 研究方向为心肌肥大的分子调控。通讯作者刘秀华, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要研究方向为缺血再灌注损伤、内质网应激、心肌肥大、微循环研究等, E-mail 为 xiaohualiu98@yahoo.com.cn.

北京大学人类疾病基因研究中心,用于原代心肌细胞培养的 24 h 内新生 Sprague-Dawley 大鼠购自北京大学医学部实验动物中心。

## 1.2 工具酶及主要试剂

限制性核酸内切酶 (NheI、EcoRI、SpeI 和 EcoRV)、T4 DNA Ligase 和 T4 Polynucleotide Kinase 及 DNA 聚合 Taq 酶等均购自大连宝生物工程公司 (Takara Bio Co Ltd); 质粒抽提试剂盒购自 Qiagen 公司, 逆转录试剂盒 EasyScript First-Strand cDNA Synthesis SuperMix 购自全式金生物技术公司 (TransGen), 引物由上海博亚生物技术有限公司 (BoYasuo Co) 合成; 阳离子脂质体 LipoFectamine 2000、胎牛血清 (fetal calf serum, FCS) 购自 Invitrogen-Gibco 公司, 新生牛血清 (new-born calf serum, NCS) 购自 PAA 公司; 辣根过氧化物酶 (horse radish peroxidase, HRP) 标记的山羊抗兔二抗、增强化学发光 (enhanced chemiluminescence, ECL) 试剂盒购自 Santa Cruz 公司。兔抗 hMR-1 多克隆抗体由本工作组自制。

## 1.3 人肌纤维生成调节因子 1 基因的克隆

在 NCBI GenBank 数据库中检索到 Homo sapiens myofibrillogenesis regulator MR-1 (AF417001) 全长 cds 针对该基因开放读码框设计引物, 上游引物 5'-GTG GGA TCT CAC CAT GGC GGC-3' (Oligo-1), 下游引物 5'-CGC TCC TCA GGT CTG CAC-3' (Oligo-2)。以心脏 cDNA 文库为模板进行聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR), 反应条件为 95°C 预变性 5 min, 95°C 变性 30 s, 60°C 退火 30 s, 72°C 延伸 30 s, 35 个循环结束后 72°C 延伸 30 s, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果, 切割凝胶回收目的条带。

## 1.4 pGEM-T Easy-hMR-1 中间载体的构建

将目的基因与 pGEM-T Easy 载体进行连接, 热激法转化感受态 E. coli XL1-Blue 过夜 37°C 培养, 次日筛选阳性克隆, 培养菌液至对数生长期, 提取质粒并以 T7 引物测序。测序结果与数据库中相应基因序列进行比对, 从而保证构建的中间载体序列正确。

## 1.5 pcDNA3.1 MycHis(-) B-hMR-1 真核表达质粒的构建和鉴定

对 pcDNA3.1 MycHis(-) B 载体 (图 1) 使用限制性内切酶 NheI + EcoRI 进行双酶切, 用 SpeI + EcoRI 处理 pGEM-T Easy-hMR-1 质粒, 1% 琼脂糖凝胶电泳后分别回收处理后的载体及目的片段, 用 T4 DNA Ligase 将这两个片段进行连接, 转化感

受态 XL1-Blue 筛选阳性克隆, 以 T7 测引物序列。

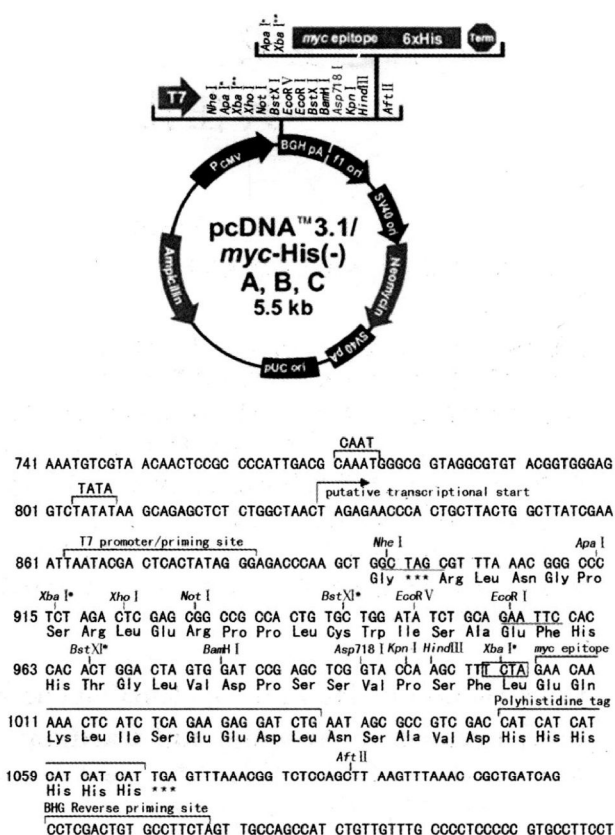


图 1 pcDNA3.1 MycHis(-) B 质粒 (上图) 及多克隆位点 (下图) 下划线标记示意 NheI + EcoRI 酶切位点。

## 1.6 细胞培养

HEK293T 细胞复苏后使用含 10% FCS 的 DMEM 培养液置 37°C、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中培养, 每隔 48 h 传代一次。SD 乳鼠心肌细胞按本室报道的方法<sup>[3]</sup>培养: 出生 24 h 内乳鼠消毒后无菌操作取心尖部组织, 剪碎成 1 mm<sup>3</sup> 大小, 加入适量 0.08% 胰蛋白酶于 37°C 水浴下机械振荡、反复消化, 制备心肌细胞悬液, 差速贴壁法去除非心肌细胞, 用含 10% NCS 的 DMEM 培养液调整细胞浓度为 3 × 10<sup>5</sup> /L 后, 每瓶 7.5 mL 悬液接种于 75 cm<sup>2</sup> 培养瓶, 孵箱内过夜培养, 次日全量更换新的完全培养液, 3 天后继代培养用于后续实验。

## 1.7 实验分组及细胞转染

培养细胞分别随机分为 3 组: pcDB-hMR-1 转染组、pcDB 空载体对照组和正常对照组。实验均采用双平行样本操作 (n = 6)。转染前 1 h 换以无血清、无抗生素的 DMEM 培养基。用阳离子脂质体 LipoFectamine 2000 分别瞬时转染 pcDB 和 pcDB-hMR-1 质粒, 转染方法参照 LipoFectamine 2000 说明书进行改进, 转染前 1 天乳鼠心肌细胞按 1 × 10<sup>4</sup> /cm<sup>2</sup> 密

度, HEK293T 按  $2 \times 10^4 / \text{cm}^2$  密度接种于底面积  $25 \text{ cm}^2$  的培养瓶, 次日转染前 1 h 换为无血清及无抗生素的培养液。脂质体混合物中的 Lipofectamine 2000 以  $1.5 \mu\text{L} / \text{cm}^2$  的用量, DNA 混合物以  $1 \mu\text{g} / \text{cm}^2$  质粒的用量配制, 二者均匀混合反应 15 min 形成转染复合物, 小心滴加入细胞培养液中, 培养物在含 5%  $\text{CO}_2$  的  $37^\circ\text{C}$  细胞培养箱中培养 4~6 h 后换为完全培养液, 继续培养用于后续实验。

### 1.8 RT-PCR 检测人肌纤生成调节因子 1 的表达

细胞转染 24 h 后提取总 RNA 并逆转录得到 cDNA, 以 cDNA 为模板与 hMR-1 引物 Oligo-1、Oligo-2 等进行 PCR 扩增, 1% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外分光光度计观察并采集图像, Image-Pro Plus (Version 4.1.1, Media Cybernetics, USA) 专业图像分析软件扫描条带的积分光密度值 (integrated optical density, OD;  $\text{OD} = \text{面积} \times \text{平均灰度值}$ )。

### 1.9 Western Blotting 检测人肌纤生成调节因子 1 的表达

细胞转染 48 h 后裂解, 将裂解物与上样缓冲液混合煮沸 10 min, 离心取上清进行 12% 的 SDS-PAGE。半干式法电转至硝酸纤维素膜上。TBST [20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.6), 137 mmol/L NaCl 和 0.1% Tween 20] 配制的 50 g/L 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 加入一抗于  $4^\circ\text{C}$  过夜反应; TBST 洗涤 3 次后, 加入 HRP 标记的抗兔二抗, 室温作用 1 h 彻底洗涤后, 于暗室发光显影; 用 Image-Pro Plus 图像分析软件测量各组条带 OD 值。

### 1.10 统计学分析

实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间两两比较用非配对  $t$  检验,  $P < 0.05$  认为差异有显著性意义。

## 2 结果

### 2.1 pDB-hMR-1 真核细胞表达质粒的构建

pGEM-T Easy-hMR-1 中间载体经 T7 引物测序后与 GenBank 中相应基因序列进行比对, 序列正确, 无突变碱基, 目的片段为反向插入; 中间载体和 pDB 质粒经酶切、连接并转化 XL1-Blue 后, 从阳性克隆所获的 pDB-hMR-1 质粒经 T7 引物测序为 TGA TTG TGG GAT CTC ACC ATG GCG GCG GTG GTA GCT GCT ACG GCG CTG AAG GCG CGG GGG GCG AGA AAT GCC CGC GTC CTC CGG GGG ATT

CTA TCC CCG GAG CTG GAA TAC ATT CCC AGA AAG AGG GGC AAG AAC CCC ATG AAA GCT GTG GGA CTG GCC TGG GCC ATC GGC TTC CCT TGT GGT ATC CTC CTC TTC ATC CTC ACC AAG CGG GAA GTG GAC AAG GAC CGT GTG AAG CAG ATG AAG GCT CGG CAG AAC ATG CGG TTG TCC AAC ACG GGC GAG TAT GAG AGC CAG AGG TTC AGG GCT TCC TCC CAG AGT GCC CCG TCC CCT GAT GTT GGG TCT GGG GTG CAG ACC TGA GGA GCG AAT CGA ATT CCA CCA CAC TGG ACT AGT GGA TCC GAG CTC GGT ACC AAG CTT TCT AGA ACA AAA ACT CAT CTC AGA AGA GGA TCT GAA TAG CGC CGT CGA CCA TCA TCA TCA TCA TCA TTG AGT TTA AAC GGT CTC CAG CTT AAG TTT AAA CCG CTG ATC AGC CTC GAC TGT GCC TTC TAG TTG CCA GCC ATC TGT TGT TTG CCC CTC CCC CGT GCC TTC CTT GAC CCT GGA AGG TGC CAC TCC CAC TGT CCT TTC CTA ATA AAA TGA GGA AAT TGC ATC GCA TTG TCT GAG TAG GTG TCA TTC TAT TCT GGG GGG TGG GGT GGG GCA GGA CAG CAA GGG GGA GGA TTG GGA AGA CAA TAG CAG GCA TGC TGG GGA TGC GGT GGG CTC TAT GGC TTC TGA GGC GGA AAG AAC CAG CTG GGG CTC TAG GGG GTA TCC CCA CGC GCC CTG TAG CGG CGC ATT AAG CGC GGC GGG TGT GGT GGT TAC GCG CAG CGT GAC CGC TAC ACT TGC CAG CGC CCT AGC GCC CGC TCC TTT CGC TTT CTT CCC TTC CTT TCT CGC ACG TTC GCC GGC TTT CCC CGT CAA GCT CTA AAT CGG GGG CTT CCC CTT TAG GGT TCC GAT TTA GTG C (正体字为载体序列, 斜体字为目的基因序列)。

### 2.2 RT-PCR 检测人肌纤生成调节因子 1 基因的体外表达

以人源性 hMR-1 引物进行扩增, 各组阳性条带大小为 755 bp 与 PCR 产物预期长度一致; 在乳鼠心肌细胞中, 只有过表达人源性 hMR-1 组为阳性, 而表达鼠源性 MR-1 的正常对照组和空载体对照组为阴性; 而在自身有内源性 hMR-1 表达的人胚胎肾上皮细胞系 HEK293T 中, hMR-1 过表达组的 mRNA 表达也显著高于正常对照组和空载体对照组 (图 2 和表 1)。

### 2.3 Western Blotting 检测人肌纤生成调节因子 1





常对照组 ( $P < 0.01$ ; 图 3 和表 1)。

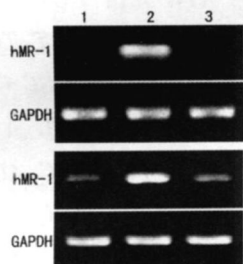


图 2 RT-PCR 检测人肌纤生成调节因子 1 mRNA 在乳鼠心肌细胞 (上图) 和 HEK 293T 细胞系 (下图) 中的表达 1 为正常对照组, 2 为 pDB-hMR-1 转染组, 3 为 pDB 空载体对照组。

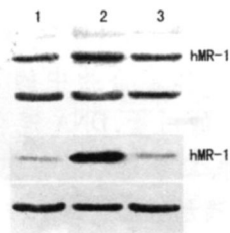


图 3 Western Blotting 法检测人肌纤生成调节因子 1 蛋白在乳鼠心肌细胞 (上图) 和 HEK 293T (下图) 中的表达 1 为正常对照组, 2 为 pDB-hMR-1 转染组, 3 为 pDB 空载体对照组。

表 1 人肌纤生成调节因子 1 mRNA 和蛋白在乳鼠心肌细胞和 HEK 293T 中的表达

| 分 组           | 乳鼠心肌细胞                     |                          | HEK 293T                   |                            |
|---------------|----------------------------|--------------------------|----------------------------|----------------------------|
|               | mRNA                       | 蛋白                       | mRNA                       | 蛋白                         |
| 正常对照组         | 0.00 ± 0.00                | 0.92 ± 0.03              | 0.68 ± 0.02                | 0.00 ± 0.00                |
| pDB 空载体对照组    | 0.00 ± 0.00                | 2.20 ± 0.12              | 8.82 ± 0.01                | 0.00 ± 0.00                |
| pDB-hMR-1 转染组 | 437.01 ± 0.40 <sup>a</sup> | 6.51 ± 0.40 <sup>a</sup> | 291.79 ± 0.50 <sup>a</sup> | 302.98 ± 0.50 <sup>a</sup> |

a 为  $P < 0.05$  与正常对照组和 pDB 空载体对照组比较。

### 3 讨论

人肌纤生成调节因子 1 (hMR-1) 是本课题组克隆并报道的一个人类功能新基因, 定位于 2q35, mRNA 全长 755 bp, 编码一段 142 个氨基酸组成的蛋白质, 研究发现该基因在哺乳动物的心肌和骨骼肌中高表达<sup>[1, 4]</sup>。前期工作研究发现, hMR-1 过表达的转基因小鼠在 Ang II 诱导下心肌肥大的程度明显增强<sup>[5]</sup>, 在 Ang II 诱导的心肌细胞肥大模型中 hMR-1 水平显著升高, 而在乳鼠心肌细胞中以 RNA 干扰技术抑制内源 hMR-1 表达后 Ang II 的致心肌细胞肥大作用被明显削弱<sup>[2]</sup>, 提示该基因可能是一种哺乳动物特有的心肌肥大相关分子。由此, 制备 hMR-1 全长的真核表达质粒对 hMR-1 的深入性功能研究十分必要。

本课题组在 2003 年和 2005 年先后构建了原核表达融合蛋白的重组质粒 pcBKT7-MR-1<sup>[6]</sup> 和 pGEX-5X MR-1<sup>[7]</sup>, 这两种质粒在真核细胞, 特别是原代培养的乳鼠心肌细胞中表达效果不甚理想, 给进一步的基因功能研究带来阻碍; 另外, 生物信息学软件分析 MR-1 的一级结构表明 MR-1 蛋白具有跨膜区段及线粒体定位信号<sup>[8]</sup>, 可定位于内质网、线粒体等与细胞生命活动相关的重要细胞器<sup>[9]</sup>, 提示对其功能机制的研究极有必要在真核细胞模型上进行。为此我们在真核表达载体 pDNA3.1/MycHis

(-) B 质粒上构建了 hMR-1 全长的表达质粒。

原代培养的哺乳动物细胞转染效率过低往往在很大程度上限制了基于外源基因表达的研究, 目前常用的外源基因导入法有电穿孔法、磷酸钙转染法和阳离子脂质体转染法等。电穿孔法的转染效率高, 但预实验结果提示其对细胞损伤较大, 磷酸钙法操作较为繁复, 可重复性不够理想。由此我们对阳离子脂质体 Lipofectan in 2000 转染方法在时间和剂量上进行了一系列探索并最终确定了最适方案。以这种方法转染 pDB-hMR-1 质粒到 HEK 293T 细胞系和乳鼠心肌细胞后, 以 hMR-1 引物进行的 RT-PCR 结果显示, HEK 293T 模型各组均为阳性, 空载体对照组和正常对照组 OD 值明显低于 hMR-1 过表达组, 而在乳鼠心肌细胞中只有 hMR-1 转染组才检测到了阳性条带。分析其原因: 来源于人类胚胎肾上皮的 HEK 293T 本身具有内源性 hMR-1 表达<sup>[10]</sup>, 而乳鼠心肌细胞虽然也有内源 hMR-1 表达但为鼠源性, 因此理论上在正常对照组和空载体对照组中不能检测到阳性表达, 我们的结果与之相符; 在蛋白水平的检测上, 乳鼠心肌细胞和 HEK 293T 中各组均检测到了阳性条带, 这与我们制备的抗 hMR-1 多克隆抗体<sup>[11]</sup> 既能识别鼠源性又可识别人源性 hMR-1 有关。

(下转第 153 页)